

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860068

研究課題名(和文) 新規昆虫生体内試験系を導入したモンゴル薬用植物の成分・薬効解析と独自の伝承の活用

研究課題名(英文) Bioactive compounds from Mongolian traditional medicinal plants and their effects evaluations to living organisms using insect

研究代表者

村田 敏拓 (MURATA, Toshihiro)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70458214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：モンゴル国伝統薬用植物の成分薬効解析により新たな医薬シーズを見出すことを目的に研究を進めた。特に各植物成分の生体内作用の評価に昆虫を用いた試験を導入して生体に対する化合物の影響を考察した。主にヒトと昆虫が共通してもつ自然免疫系に着目し、エンドウヒゲナガアブラムシを用いてフェノール酸化酵素前駆体カスケードへの植物成分の作用を評価し、フェノール酸化酵素阻害物質を *Atraphaxis frutescens* より見出して報告した。更に *Oxytropis lanata* に含まれる抗トリパノソーマ活性新規オキサゾールアルカロイドをはじめとして生物活性成分を40種類以上見出した。

研究成果の概要(英文)：Traditional medicines based on natural plants have been used to treat various diseases in Mongolia. Many of them are known as having unique traditions for inflammatory and infectious diseases, and some of them were selected to find pharmaceutical seeds in this project. After the active guided isolations of compounds from Mongolian plants, the purified compound structures including absolute configuration were determined by spectroscopic methods. Then the compounds inhibitory activities against various enzymes, bacteria, protozoa, and insects were evaluated. Pea aphid was used as a model of living organisms, and assay methods were developed using insect immune system which similar to human innate immune system. Phenoloxidase is a component of the insect immune system, and its inhibitors were identified from *Atraphaxis frutescens*. Furthermore, Trypanocidal new oxazoles, anti-bacterial diterpenoid, and anti-insect acetylcholinesterase phenylpropanoid were isolated from Mongolian plants.

研究分野：生薬学

キーワード：モンゴル国 国際情報交換 伝統医学 薬用植物 薬効成分 化学構造解析 昆虫 生物活性試験

## 1. 研究開始当初の背景

モンゴル国では有用植物が 1400 種以上知られ、独自の薬効が遊牧民により伝承されてきた。漢方と同様に処方(薬草処方)も存在し、三大伝統医学やチベット医学の薬物と同様に様々な薬能が伝えられている。モンゴル国では社会主義体制の放棄後に伝承医学の重要性が高まり、薬草処方が鍼灸などと並び伝統医療の根幹を成している。しかし国民の大半が遊牧生活を送ってきた経緯から、大学など教育研究機関による研究活動は充分でなく設備も整っていない。薬用植物に関しても植生調査が主であり、化学的・薬理学的検討は限定的なため、薬効解析により科学的な根拠を示すことが急務である。

特に遊牧民の生活において免疫疾患や細菌性疾患は頻繁に遭遇し、治療や予防は薬草に頼ってきた背景から、薬効に免疫系や炎症への作用、免疫賦活作用、感染症がある植物が数多く存在する(モンゴル国有用植物図鑑)。これらの薬効成分と機序を明らかにできれば、根治や緩和が困難な関節リウマチやアレルギーなど免疫・炎症性疾患及び重篤な感染症の新規治療薬や予防薬の開発につながる。そこで免疫に関与する植物成分を明らかにしてきた経緯を活かして、次の二点を軸に研究を展開する。

(1) モンゴル薬用植物の含有成分を迅速に解析する。

(2) 新規昆虫生体内試験系をはじめ活性試験を駆使して薬効の根拠や生体内作用を明らかにする。

これにより未だ決定的な治療法が無く、新しい治療や予防を実現する医薬が強く求められている上記難治性疾患への活用法を提案する。またモンゴル国内外で薬草処方が有効、安全に使用されることにも貢献する。独自の薬効が多様に伝承されるモンゴル薬用植物は新規の活用法や医薬シーズを見出すために優れた対象であり、背景が類似する日本の重要生薬との比較により新薬や代替品の開発など相乗的な研究成果が期待できる。

## 2. 研究の目的

豊富な植物資源と数多くのユニークな薬効の伝承からなるモンゴル薬用植物について、その有効性と薬効の科学的根拠を、含有成分の徹底解析と生物活性試験により先駆的に解明する。特に有効成分の生体での作用や効果を解析するため、評価系に昆虫を用いた新規生体内活性試験系を確立して導入し、昆虫をモデルに生体内作用メカニズムに関する考察を得る。

以上により、免疫系や炎症が関与する慢性・難治性疾患、感染症の治療や予防に効果的なモンゴル薬用植物の活用法を提案するほか、含有成分の化合物ライブラリーを構築して医薬シーズを見出す。

またモンゴルの薬草処方は日本の生薬や漢方処方と背景や起源が類似することから、

成分や活性、伝承を比較することで、双方のより有効な使い方や希少生薬の代替品を探索する。

## 3. 研究の方法

地域の伝統・伝承医学の一端を担うモンゴル薬用植物を扱うため、現地の専門家と協力して本申請課題を進めた。すなわち使用頻度が高い薬用植物や伝承事項について共同で調査・協議し、研究の進め方や方針を調整することで互恵関係を軸に密な連携を図った。協議によって選んだ植物について、主に成分解析と昆虫試験系や各種生物活性試験系による評価を中心に研究を進めた。

### (1) モンゴル薬用植物の成分研究

対象として選んだモンゴル薬用植物の含有成分を迅速に明らかにするため、エキス並びに活性画分から各種クロマトグラフィーにより成分を単離精製し、NMRを中心とした各種スペクトル解析や化合物に応じて化学的手法、X線結晶構造解析により絶対立体配置を含めた化学構造を決定した。当初の計画していた植物に加えて、初年度から最終年度を通じて可能な限り解析を続けた。

### (2) 新規昆虫試験系の確立

初年度には昆虫生体を用いた再現性の高い新規試験法を確立することを目標に、免疫疾患や炎症性疾患などを標的として、主に異物に対して反応した結果メラニンを生じるまでの昆虫自然免疫反応を利用した試験法を検討、実施した。供試昆虫には申請者が継代飼育しており、各試験系に適したエンドウヒゲナガアブラムシ: *Acyrtosiphon pisum*を選んだ。二年目は、初年度に生じた問題点を整理し、自然免疫反応に関連する昆虫生体メカニズムについて知見が得られるよう、各免疫反応の段階ごとに作用する物質を選別できないかを試みた。またフェノール酸化酵素や昆虫の生体酵素の単離を目的に電気泳動やイオン交換カラムによる精製を試みた。最終年度は免疫カスケードの最終段階であるメラニン化を抑制する物質を見出すための実験を中心に行った。

免疫関連の試験とは別にヒト、昆虫ともに神経伝達の重要な部分を担うアセチルコリンエステラーゼについても着目した。すなわち昆虫(エンドウヒゲナガアブラムシ)のアセチルコリンエステラーゼ阻害活性試験を簡易的にかつ最も効果的に行える試験条件を検討した後、ヒト赤血球アセチルコリンエステラーゼで阻害活性を示した化合物について、昆虫の場合でも活性を示すかどうかを試験した。

### (3) 寄生虫対策や感染性疾患に使用されるモンゴル薬用植物の選定と抗原虫活性試験

昆虫生体メカニズムに関連して、寄生虫に対して用いられるあるいは、感染性疾患に関

連する薬効が伝承されるモンゴル薬用植物を選定し、エキスや含有成分について、昆虫や病原性原虫である抗トリパノソーマ活性(帯広畜産大学の協力者らによる)を評価した。

(4) 国内外の協力者とともに幅広い生物活性試験を実施できる体制を整備し、この研究で得られた化合物については、モンゴル国立大学における抗菌試験やモンゴル科学アカデミー、当教室における抗酸化活性やリポキシゲナーゼ阻害活性など多様な生物活性試験系での評価を横断的に進め、有用性に関する知見を得た。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Atraphaxis frutescens*

タデ科植物 *Atraphaxis frutescens* はモンゴル国において細菌性の熱やのどの炎症などに用いられる伝統薬として知られる。一般的に *Atraphaxis* 属植物はフラボノイド類が豊富に含まれていること、高い抗酸化活性を有することが知られており、当課題では含有成分の探索と得た化合物のエンドウヒゲナガアブラムシフェノール酸化酵素阻害活性、DPPH ラジカル消去活性について検討した。

結果として

*A. frutescens* の地上部より、含有成分として6種類の新規フラボノイド類(AF-1, 図1)と新規ベンジル配糖体をはじめとする合計33種類の化合物を単離し、それらの化学構造を決定した。

得た化合物について、アブラムシのフェノール酸化酵素及びマッシュルーム由来チロシナーゼに対する阻害活性試験を行い、前者にはフェニルプロパノイドアミド(AF-2, 図1)、後者にはピロガロール構造を特徴とした新規フラボノール類が阻害活性を示すことを明らかにした。また前者は特に *N*-phenylthiourea によって強く阻害されることも確認した。

得た化合物について、DPPH ラジカル消去活性について検討した結果、今回得た新規化合物は全て陽性対照の trolox ( $IC_{50}$  28.2  $\mu$ M) と同程度の活性を示した。

以上により本植物の強い抗酸化活性の要因となり得る成分を明らかにできた他、昆虫自然免疫の一翼を担うフェノール酸化酵素への植物成分の影響について知見を得た。( *J. Nat. Prod.* **2016**, 3065-3071)

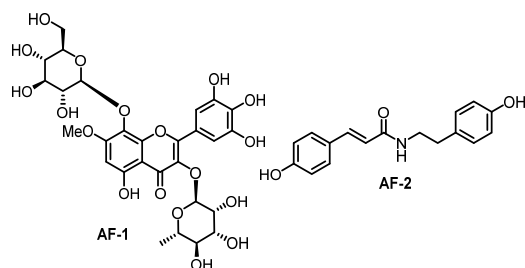


図1 *A. frutescens* 由来活性化合物の例

##### (2) *Oxytropis lanata*

マメ科 *Oxytropis* 属植物は家畜に対する毒性が知られる一方で本種はモンゴル国で熱性疾患や骨の疾患の治療に利用される薬用植物である。本課題では根に含まれる成分の探索を行った。

結果として11種類のオキサゾールアルカロイド(OL-1, 図2)を天然から初めて見出し報告した。またこれらの化合物について抗トリパノソーマ活性(帯広畜産大学の協力者らによる)の検討を行った結果、複数のオキサゾールが有力な活性を示した。( *J. Nat. Prod.* **2016**, 2933-2940)

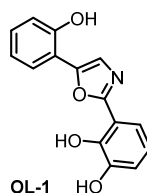


図2 *O. lanata* 由来新規オキサゾールの例

一般的に *Oxytropis* 属植物は家畜が摂取すると狂うほど苦しむという swainsonine を含むことが知られる。一方で本研究によって植物成分としては珍しいオキサゾール類が多種類含まれることが明らかになった。これらオキサゾールが抗原虫活性を示したことから今後の研究展開で特徴的な使い方が見い出されることが期待できる。

##### (3) *Caryopteris mongolica*

シソ科植物 *Caryopteris mongolica* はモンゴル国においてリウマチや痛み、腫れの治療に用いられる薬用植物として知られている。精油成分やフラボノイド類の含有は知られていたが、ジテルペノイドの存在が明らかになったため、詳細な解析を行った。

結果として

*C. mongolica* の根部より11種類の新規アビエタン型ジテルペノイドを単離して構造を決定した。また incanone を同時に単離し、x線結晶構造解析(静岡県立大学の協力者らによる)によって絶対立体構造を明らかにした(図3)。得た化合物についてはコリンエステラーゼ阻害活性を検討し、複数のジテルペノイドにヒト赤血球由来アセチルコリンエステラーゼ(AChE)、及びウマ由来ブチリルコリンエステラーゼに対する阻害活性を認めた。( *Phytochemistry*, **2016**, 152-158)

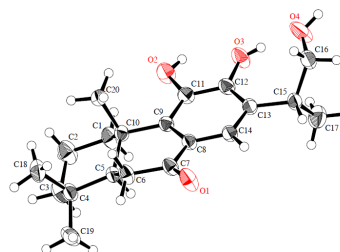


図3 Incanone の立体構造

*C. mongolica* の根部のエキスは有力な抗グラム陽性菌活性を示すことが、モンゴル国立大学の共同研究者によって明らかにされていた。そこで本研究で根から得た成分について抗菌試験を行い（モンゴル国立大学の協力者らによる）、その活性本体物質を探索したところ、オルトキノン構造を有する特徴的な新規ジテルペノイドが *Staphylococcus aureus* をはじめとするグラム陽性菌に有力な活性を示すことを見出した。(Bioorg. Med. Chem. Lett., 2015, 2555-2558)

*C. mongolica* の地上部より新規ジテルペノイド配糖体と4種類の新規フラボン配糖体を含む合計20種類の化合物を単離して化学構造を決定した。また2種類のジテルペノイドについてコリンエステラーゼ阻害活性を示すことを明らかにした。(J. Nat. Med., 2015, 471-478)

上記で得たコリンエステラーゼ阻害物質についてアブラムシの AChE について阻害活性を検討したが、有意な結果は得られなかった。しかし *C. mongolica* から抗菌成分や認知症治療薬への応用も期待されるコリンエステラーゼ阻害活性成分が多く見いだされたことは、この薬用植物の有用性や含有成分の医薬シーズとしての可能性を確認できる結果であった。

#### (4) *Thymus gobicus*

シソ科 *Thymus gobicus* はモンゴル国において、風邪や咳、痛み止めや炎症に用いられる身近な薬用植物で、ハーブとしてウランバートル市内の薬局でも手に入れられるほど普及している。

今回成分薬効研究を行った結果、monardic acid A (TG-1, 図4, 生薬「紫根」などに含まれ、多様な生物活性が知られる lithospermic acid のジアステレオマー) や nepetoidin B (TG-2, 図4) をはじめとする8種類の化合物を得た。上記の2成分はヒト赤血球由来 AChE に対して阻害活性を示すことを明らかにした (Mongol. J. Chem., 2016, 14-17)。更にアブラムシ AChE 阻害活性の評価方法の最適化を試み、実施したところ nepetoidin B が阻害活性を有することを確認した。

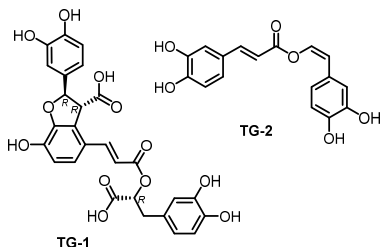


図4 *T. gobicus* 由来活性化合物の例

#### (4) その他のモンゴル国薬用植物について

昆虫に対しエキスの段階で毒性を示したキク科 *Brachanthemum gobicum* より新規アシリ化リグナン11種類を含む47化合物を単

離して、生物活性の検討を行っている。

ユキノシタ科 *Saxifraga spinulosa* より抗ピロプラズマ活性を示した新規フラボノイド配糖体を見出し、成果を広く公表していく予定である。

日本国内で利用される漢方薬に配合される生薬基原と同種でありモンゴル国に自生している植物の成分解析も協力者のモンゴル科学アカデミー Odontuya 博士と進め、シャクヤク *Paeonia lactiflora* やその近縁種の成分や使用方法について調査を行った。

(6) 以上を通して、モンゴル国で伝統的に利用されてきた薬用植物の薬効の根拠を説明できる数多くの成果を得たほか、昆虫の生体と植物成分の相互作用について知見を得ることができ当初予定していた計画を達成した。更にモンゴル薬用植物が有する成分の傾向や活性の特徴、伝承を日本の類似の生薬や漢方処方と比較し、相互の効果的な活用法や代替可能性を調べた他、協力者と活用の具体化に向けた協議を行い、本課題終了後も持続的にモンゴル薬用植物の研究を主導・先端的に実施できる関係性に発展している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Antioxidant Flavonols and Phenolic Compounds from *Atraphaxis frutescens* and Their Inhibitory Activities against Insect Phenoloxidase and Mushroom Tyrosinase

Odonbayar B., Murata T., Batkhuu J., Yasunaga K., Goto R., Sasaki K.

*J. Nat. Prod.* 査読有, **79**, 3065-3071 (2016)

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00720

Abietane-type diterpenoids from the roots of *Caryopteris mongolica* and their cholinesterase inhibitory activities

Murata T., Ishikawa Y., Saruul E., Selenge E., Sasaki K., Umehara K., Yoshizaki F., Batkhuu J.

*Phytochemistry* 査読有, **130**, 152-158 (2016)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.05.011>

Trypanocidal Activity of 2,5-Diphenyloxazoles Isolated from the Roots of *Oxytropis lanata*

Banzragchgarav O., Murata T., Odontuya G., Buyankhishig B., Suganuma K., Davaapurev B., Inoue N., Batkhuu J., Sasaki K.

*J. Nat. Prod.* 査読有, **79**, 2933-2940 (2016)

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00778

Chemical constituents of aerial parts of *Thymus gobicus* and their cholinesterase inhibitory activities  
Odonbayar B., Murata T., Matsumoto N., Batkhuu J., Sasaki K.  
*Mongolian Journal of Chemistry* 査読有, **17**, 14-17 (2016)  
DOI: 10.5564/mjc.v17i43.740

An antibacterial *ortho*-quinone diterpenoid and its derivatives from *Caryopteris mongolica*  
Saruul E., Murata T., Selenge E., Sasaki K., Yoshizaki F., Batkhuu J.  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, **25**, 2555-2558 (2015)  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.04.048

Cholinesterase-inhibitory diterpenoids and chemical constituents from aerial parts of *Caryopteris mongolica*  
Murata T., Selenge E., Oikawa S., Ageishi K., Batkhuu J., Sasaki K., Yoshizaki F.  
*J. Nat. Med.* 査読有, **69**, 471-478 (2015)  
DOI: 10.1007/s11418-015-0908-6

〔学会発表〕(計 10 件)

Cholinesterase inhibitory activities of the chemical constituents of Mongolian plants、Murata T., Batkhuu J., Selenge E., Saruul E., Odonbayar B., Banzragchgarav O., and Sasaki K., Fourth International Conference on Chemical Investigation and Utilization of Natural Resources, 2016、モンゴル国ウランバートル、会期 2016 年 7 月

*Oxytropis lanata* 根に含まれる 2,5-diphenyloxazole 類と抗トリパノソーム活性、Orkhon Banzragchgarav, 村田敏拓, Gendarum Odontuya, Buyanbmandakh Buyankhishig, 菅沼啓輔, Bekh-Ochir Davaapurev, 井上昇, Javzan Batkhuu, 佐々木健郎、日本生薬学会第 63 回年会、富山国際会議場(富山県・富山市)、会期 2016 年 9 月

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0148948/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 敏拓 (MURATA, Toshihiro)  
東北医科薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 7 0 4 5 8 2 1 4

### (4) 研究協力者

BATKHUU, Javzan  
モンゴル国立大学・応用科学研究科・教授

DAVAAPUREV, Bekh-Ochir  
モンゴル国立大学・応用科学研究科・講師

ODONTUYA, Gendaram  
モンゴル科学アカデミー・化学工学部門・主任研究員

SELENGE, Erdenechimeg  
モンゴル薬科学大学・講師

石川 吉伸 (ISHIKAWA, Yoshinobu)  
静岡県立大学・薬学研究院・准教授  
研究者番号: 0 0 3 0 5 0 0 4

梅原 薫 (UMEHARA, Kaoru)  
静岡県立大学・薬学研究院・准教授  
研究者番号: 4 0 1 8 5 0 7 0

菅沼 啓輔 (SUGANUMA, Keisuke)  
帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター特任助教  
研究者番号: 6 0 7 7 2 1 8 4

佐々木 健郎 (SASAKI, Kenroh)  
東北医科薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 9 0 2 4 4 9 7 0